

Doktori értekezés tézisei

**Az FcRn transzgén állatok humorális immunválaszát
befolyásoló T sejtek és antigén bemutató sejtek
funkcionális vizsgálata**



Farkas Anita

Témavezető: Dr. Kacs Kovics Imre

Prof. Dr. Matkó János

ELTE TTK Biológiai Doktori Iskola

Doktori Iskola Vezető: Prof. Dr. Erdei Anna

Immunológiai Program

Programvezető: Prof. Dr. Erdei Anna

ELTE TTK Biológiai Intézet, Immunológiai Tanszék

2013.

Bevezetés

A neonatalis Fc receptor (FcRn) szerepe az IgG homeosztázisban már régóta ismert. Alapvető funkciói közé tartozik, hogy részt vesz a maternális IgG transzportban, valamint gátolja az endotélsejtekben és a monocitákban zajló IgG és albumin lebomlást, növelve ezzel e két fontos plazmafehérje fél-életidejét. Az utóbbi időben kiderült, hogy az FcRn emellett fontos szerepet tölt be az antigén prezentáló sejtek (APC) immunkomplex (IC) fagocitózisában és azáltal, hogy az IC-t lizoszómális útvonalra irányítja, fokozza az antigén prezentációt.

Kacs Kovics és Mtsai klónozták és karakterizálták a szarvasmarha FcRn-t (bFcRn), majd funkcionális analíziséhez BAC transzgenezissel létrehozták a bFcRn-t fokozott mértékben kifejező transzgén egereket. A transzgén szövetspecifikusan, az egér FcRn-t is kifejező szövetekben jelenik meg (endotél sejtek, máj, vese, lép, nyirokcsomó, uterus, placenta, APC-k). A munkacsoport eredményei szerint a bFcRn fokozott mértékű

kifejeződésének köszönhetően csökken az antigén specifikus IgG lebontás, fokozott a humorális immunválasz, ami megnövekedett IgG és IgM titerben jelentkezik. A lépben az antigén specifikus immunsejtek száma nő és a sejtek aránya megváltozik, belőlük nagyobb számú antigén specifikus hibridóma állítható elő. Gyengén immunogén antigénekkal szemben is hatékony immunválasszal reagál.

Az FcRn nagymértékű kifejeződésének humorális immunválaszt fokozó tulajdonsága előnyös lehet az antitestgyártásban elterjedt nyulak esetén is.

Célkitűzések

- **A nyúl FcRn (rFcRn) kimutatása immunsejtekben**

A nyulak fontos helyet foglalnak el a monoklonális és poliklonális antitestgyártásban, így egy olyan nyúl vonal létrehozása, mely fokozott mértékben fejezi ki az FcRn-t iparilag is kiemelkedő jelentőséggel bírna. Célkitűzésünk a nyulból izolált peritoneális makrofágokban és a vérből

kinyert neutrofil granulocitákban az rFcRn kimutatása volt.

- **A bFcRn kifejeződés kimutatása immunsejtekben**

A bFcRn tg egér lépéből fluoreszcens sejtszortírozással izolált immunsejtekből (T, B, MΦ, DC, Gr) és peritoneális makrofágokból a bFcRn mRNS szintű kimutatása.

- **A fagocitózis hatékonyságának vizsgálata peritoneális makrofágokon és csontvelői eredetű dendritikus sejteken**

A bFcRn tg és vad típusú egerekből származó antigén prezentáló sejtek (APC) fagocita funkciójának tesztelése ovalbumint tartalmazó immunkomplex (OVA-IgG) felhasználásával. Vizsgálni kívántuk, hogy az FcRn kifejeződés fokozása előnyt jelent-e az APC-k számára az antigén felvétel mechanizmusában.

- **Vizsgálni kívántuk, hogy a peritoneális makrofágok és csontvelői eredetű dendritikus sejtekben a bFcRn kifejeződés fokozása befolyásolja-e más -a folyamatban szerepet játszó- fehérjék kifejeződését**

Az antigén felvételében szerepet játszó Fcγ receptorok sejt felszíni megjelenését és a hatékony antigén bemutatásban elengedhetetlen kostimulátor molekulák (CD80, CD86), valamint az MHC II sejt felszíni

expresszióját kívántuk tanulmányozni vad típusú és bFcRn tg egerekből származó makrofágokon és dendritikus sejteken, IC-vel történő kezelés után.

- **Vizsgálni kívántuk, hogy a bFcRn kifejeződés fokozása befolyásolja-e a T helper sejtek proliferációs hatékonyságát**

A vad típusú és bFcRn tg egérből származó APC-k antigén bemutató, T sejt proliferációt kiváltó képességét hasonlítottuk össze IC-vel feltöltött peritoneális makrofágok és dendritikus sejtek segítségével.

Alkalmazott módszerek:

- PCR
- Reverz- transzkripció PCR
- áramlási citofluorimetria (FCM)
- fluoreszcens sejt szortírozás (FACS)
- konfokális lézerpásztázó mikroszkópia
- csontvelői őssejt differenciáltatás dendritikus sejt irányba
- peritoneális makrofág izolálás
- T sejt proliferáció radioaktív timidin beépülés mérésével

Eredmények:

- Sikerült kimutatni a nyúl FcRn kifejeződését peritoneális makrofágokból és vérből izolált neutrofil granulocitákból.
- Sikerült kimutatni a bFcRn tg egerekből a bFcRn kifejeződését lépéből izolált makrofágokból, dendritikus sejtekből, neutrofil granulocitákból. A B- és T limfociták FcRn kifejezése továbbra is kérdéses maradt.
- Fokozott fagocita funkciót sikerült kimutatnunk peritoneális makrofágokból és dendritikus sejtekből, ha az antigént IgG immunkomplex formájában adtuk a sejtekhez.
- Sikerült kimutatni, hogy a tg állatokból származó dendritikus sejtek az immunkomplex felvételét követően hatékonyabban képesek az antigén specifikus T helper sejtek proliferációját kiváltani, mint a kontroll állatok hasonló sejtjei. A szolubilis antigénnel végzett kísérleteink során nem volt

kimutatható különbség az antigén specifikus T sejt válaszban, amely az FcRn szerepét igazolja.

- Makrofágnál a hatékony fagocita funkció mellett nem sikerült hatékonyabb antigén prezentációt kimutatni a bFcRn-t kifejező egerekben. Így megállapítható, hogy az FcRn overexpresszió a makrofágok antigén bemutató képességét nem befolyásolja jelentős mértékben.
- A dendritikus sejtek sejtfelszínén megjelenő kostimulátor molekulák, MHCII és Fc γ receptorok expresszióját vizsgálva elmondható, hogy sem a CD80/CD86 sejtfelszíni expressziója, sem pedig az MHC II és Fc γ expressziója nem mutat szignifikáns különbséget a bFcRn-t overexpresszáló dendritikus sejtek felszínén a kontroll állatokhoz viszonyítva. Tehát a fokozott antigén-specifikus T sejt aktiváció mögött nem ezeknek molekulák megnövekedett expressziója áll.

Megbeszélés:

A nyúl és egér immunsejtekben sikerült kimutatni az FcRn expresszióját. Ezekben a sejtekben az FcRn elsősorban immunfolyamatok szabályozását látja el, IgG-t védő mechanizmusa mellett. A létrehozott bFcRn tg egerekben az FcRn kifejeződésének fokozása hatékonyan növeli a peritoneális makrofágok és csontvelőből differenciáltatott dendritikus sejtek fagocitózist, ha az antigén-IgG immunkomplex formájában van jelen. Emellett nem találtunk Fcγ receptor sejt felszíni expresszió fokozódást. A peritoneális makrofágok esetén nem volt kimutatható antigén bemutatás fokozódás, azonban a csontvelőből differenciáltatott dendritikus sejtek esetén a fokozott fagocitózis igen hatékony antigén bemutatással párosult, melyet nem az MHC II vagy kostimulátor molekulák fokozott kifejeződése okoz. Így elmondható, hogy a megnövekedett fagocita funkció és T sejt proliferáció az FcRn kifejeződés fokozásának eredménye.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

Vegh A ♦, Farkas A ♦, Kovesdi D, Papp K, Cervenak J, Schneider Z, Bender B, Hiripi L, Laszlo G, Prechl J, Matko J, Kacs Kovics I (2012) **FcRn Overexpression in Transgenic Mice Results in Augmented APC Activity and Robust Immune Response with Increased Diversity of Induced Antibodies.** PLoS One 7 (4):e36286. doi:10.1371/journal.pone.0036286 (IF: 4,411)

♦ megosztott első szerzős cikk

Catunda Lemos AP, Cervenak J, Bender B, Hoffmann OI, Baranyi M, Kerekes A, Farkas A, Bosze Z, Hiripi L, Kacs Kovics I. (2012) **Characterization of the rabbit neonatal Fc receptor (FcRn) and analyzing the immunophenotype of the transgenic rabbits that overexpresses FcRn.** PLoS One. 2012;7(1):e28869. doi: 10.1371/journal.pone.0028869. (IF: 4,411)

Egyéb közlemények:

Izsepi E, Balogh A, Farkas A, Molnar A, Solymos E, Toth EA, Csepanyi-Komi R, Matko J. (2012) **The AC8 IgG3 monoclonal anti-cholesterol antibody modulates uptake and presentation of antigens for T cell activation.** Immunol Lett. 2012 Mar 30;143(1):106-15. doi: 10.1016/j.imlet.2012.01.009. (IF: 2,511)

Farkas A, Horváth É, Paul M, Varankáné László K, Fekete M, (2003) **A B12-vitaminhiány korai diagnosztizálásának laboratóriumi lehetőségei,** Klinikai és kísérletes laboratóriumi medicina 30:(3) pp. 106-118. (2003)

Nemzetközi és hazai konferencia kiadványban megjelent absztraktok

Anita Farkas, Dorottya Kövesdi, Glória László, János Matkó, Imre Kacs Kovics: **Enhanced IgG-immune complex phagocytosis and antigen presentation in macrophages and dendritic cells isolated from tg mice that overexpress FcRn**. Immune-related Pathologies: Understanding Leukocyte Signaling and Emerging therapies (IMPULSE) EFIS-EJI Symposium, Visegrad, Hungary, 2011

Farkas Anita, Kövesdi Dorottya, Magna Melinda, Bender Balázs, László Glória, Matkó János, Kacs Kovics Imre: **Az FcRn fokozott kifejeződése növeli az immunkomplexek fagocitózisának hatékonyságát makrofágokban és neutrofil granulocitákban**, Magyar Immunológiai Társaság Ifjúsági Kongresszusa, Harkány, 2009

Farkas Anita, Kövesdi Dorottya, László Glória, Matkó János, Kacs Kovics Imre: **Az FcRn fokozott kifejeződése dendritikus sejteken és makrofágokban növeli az immunkomplexek fagocitózisának hatékonyságát és az antigén prezentációt**, Magyar Immunológiai Társaság 40. Vándorgyűlése, Kecskemét, 2011

Cervenak Judit, Schneider Zita, Vegh Attila, Baranyi Mária, Farkas Anita, Bender Balázs, Papp Krisztián, Prechl József, Bősze Zsuzsanna, Erdei Anna és Kacs Kovics Imre: **Az FcRn transzgénikus állatok kimagasló immunválasza jelentősen fokozza a mono- és poliklonális ellenanyagok előállításának hatékonyságát**, Magyar Immunológiai Társaság 40. Vándorgyűlése, Kecskemét, 2011

Lemos Ana Paula Catunda, Cervenak Judit, Bender Balázs, Hoffmann Ivett Orsolya, Baranyi Mária, Kerekes Andrea, Farkas Anita, Bősze Zsuzsanna, Hiripi László, Kacs Kovics Imre: **A nyúl FcRn karakterizálása; az FcRn transzgénikus nyulak immunfenotípusának jellemzése**, Magyar Immunológiai Társaság 41. Vándorgyűlése, Debrecen, 2012